

PCT/JP03/00668

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 8月27日

REC'D 21 MAR 2003

出願番号
Application Number:

特願2002-247023

[ST.10/C]:

[JP2002-247023]

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

オリンパス光学工業株式会社

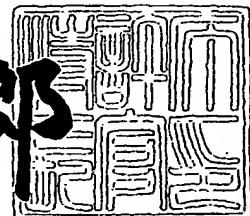
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3013173

【書類名】 特許願

【整理番号】 02P01398

【提出日】 平成14年 8月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/00
A61B 19/00

【発明の名称】 核酸配列の変異検出方法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 長岡 智紀

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 佐藤 卓朋

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 金子 善興

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 畠中 みどり

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 福岡 荘尚

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 坂本 宙子

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【代理人】

【識別番号】 100064908

【弁理士】

【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】 100101465

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】 100094400

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】 100086379

【弁理士】

【氏名又は名称】 高柴 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100118913

【弁理士】

【氏名又は名称】 上田 邦生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0207288

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸配列の変異検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の配列を検出する方法において、当該プローブの配列の種類が複数であり、

当該シグナルの測定が、カイネティックなデータ取得により行われることを特徴とする、核酸配列の変異検出方法。

【請求項2】 前記のカイネティックなデータ取得が、標的核酸とプローブとの間の反応の測定条件又は検出条件を変更しながら行われることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記のシグナルのカイネティックな測定が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行われる、請求項2に記載の方法

【請求項4】 前記の変更が、反応温度についての変更である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記の複数種類の配列のプローブが、互いに重なり合う配列を有することを特徴とする、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 前記の複数種類の配列のプローブが、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1種類以上の不完全マッチプローブと、

当該完全マッチプローブ及び当該不完全マッチプローブの両端において塩基配列を伸張するか、又は短縮したオーバーラッピングプローブとからなることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸配列の変異検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子の突然変異情報の解析、疾病の予知や診断、ウイルスのタイピング等を行う遺伝子診断に関する技術が近年大幅に進歩している。例えば、正常な遺伝子配列を有する核酸、又は当該遺伝子配列中に既知の突然変異を含む核酸のそれに相補的なDNAプローブを予め用意しておき、ここに、変異の有無が不明である試料DNAを各種プローブにそれぞれ別個にハイブリダイズさせ、これらのハイブリダイズの量を検出・比較し、より多くハイブリダイズが行われるプローブの方がサンプルDNAとの相補性が高いことを判断することが行われている。即ち、正常DNAに相補的なプローブへのハイブリダイズ量が多ければ、サンプルDNAは正常であり、逆に突然変異DNAに相補的なプローブへのハイブリダイズ量が多ければ、サンプルDNAは突然変異を起こしていると推定できる。

【0003】

ハイブリダイズの検出には、例えばサンプルDNAに検出可能な標識を施し、その標識を検出することで間接的にDNA量を検出する方法がとられている。一般にこのような標識には、蛍光やRI(放射性同位体)、化学発光等が用いられている。

【0004】

また、このようなDNAの持つ相補性を利用したハイブリダイズ反応をベースとし、数百個乃至数万個のDNAプローブを、格子状に配列させ、核酸試料を含む溶液をこのアレイ上でハイブリダイズさせることで、複数の遺伝子の情報を一括して検出するDNAマイクロアレイと呼ばれるシステムが普及し始めている。

【0005】

DNAマイクロアレイを利用すると、複数の遺伝子についての情報を同時に解析することが可能であり、通常はmRNAの発現解析に用いられることが多いが、一方でこれを遺伝子の突然変異やSNP(一塩基変異多型)に応用した例も見受けられる。

【0006】

一塩基の変異を高速かつ感度よく検出することは、一般に非常に困難である。そのため、例えば特開2001-50931号公報においては、DNAマイクロアレイにおいて電気化学反応を併用し、一塩基の変異を検出する方法が提案されている。この文献では、DNAマイクロアレイの各アレイ要素ごとに電極を付与し、電圧を印加することで反応速度を上げている。

【0007】

一塩基の変異検出の別の具体例としては、特表2000-511434号公報が挙げられる。この方法は、塩基の変異に対応したプローブを用意し、その特異性を利用して変異を特定するものであるが、一塩基変異の差を確実に検出するために、ミスマッチヌクレオチドを含むプローブを利用している。これはパーエクトマッチしたハイブリッドと一塩基が変異したプローブとのハイブリッドについてのTmの差よりも、一塩基が変異したプローブとのハイブリッドと二塩基が変異したプローブとのハイブリッドについてのTmの差の方が大きくなることを利用したものである。しかしこの方法においては、絶対的なハイブリダイズ強度が低下するために、反応により多くの時間がかかることや、感度の点でも問題がある。

【0008】

これら従来の方法においては、ハイブリダイズの反応速度は不十分であり（通常は数時間乃至十数時間）、高速の検出を行うには、複雑な構成のチップを用いる必要があった。そのために装置や核酸の検出を行うチップが大型化したり、コスト高につながっていた。また、特異性を上げるために反応温度を上昇させる必要があり、これに起因して反応時間の遅延、そしてひいてはハイブリッドの検出時間の長時間化が生じていた。特に一塩基のみの変異の有無を精度よく検出しうとする場合においては、このような問題が顕著であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

一塩基変異を検出する場合のように、DNA全体の長さに対して一塩基のみしか変異していない場合には、プローブと標的DNAの相補性に関する程度の差

が大きくななく、ハイブリダイズの度合いについての差が実質的に生じていないために、突然変異を検出することができなかった。つまり、一塩基の変異を検出するには、塩基長に対する変異の割合を高めるために、塩基長が短い方が好ましいが、一方で、配列が短か過ぎるプローブの場合には、反応温度を下げる必要性から、標的DNAに非特異的にハイブリダイズする量が増えてしまう。そのために、精度の高い検出が行えないという問題が生じる。このように従来の方法では、一塩基の変異を精度よく且つ高速に検出することが困難であった。

【0010】

更に、一塩基の変異を精度よく且つ高速に検出しようとする系においては、反応条件を、検出される配列に適したものへと限定する方向性（系の最適化）がでてくることに起因して、多数の種類の標的配列を検出しようとする場合には、標的配列の数だけ測定を繰り返す必要が生じてしまい、結果として実験全体にかかる時間が長時間化するという問題が生じる。従って、個々の配列の検出時間が短縮されても、複数の配列を検出しようとする実験系の場合には、全体にかかる時間が長くなるという問題が存在する。

【0011】

従って、標的核酸の複数種類の配列についての変異を、たとえそれが一塩基における変異であっても、精度よく且つ高速に検出できる検出方法であって、一度により多くの種類の変異を検出できる方法が提供されれば望ましい。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の従来技術についての種々の問題点に鑑み、銳意研究を進めたところ、同一系内での標的核酸の検出に使用するプローブの配列の種類を複数とし、シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことにより、複数の変異や、多数の種類の核酸についての情報も簡便に短時間で得ることが可能になることを見いだし、本発明を完成した。

【0013】

即ち本発明の核酸配列の変異検出方法は、標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核

酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の配列を検出する方法において、当該プローブの配列の種類が複数であり、当該シグナルの測定が、カイネティックなデータ取得により行われることを特徴とする。

【0014】

本発明の核酸配列の変異検出方法においては、前記のカイネティックなデータ取得が、標的核酸とプローブとの間の反応の測定条件又は検出条件を変更しながら行われることが望ましく、より具体的には、前記のシグナルのカイネティックな測定が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行われる。

【0015】

本発明の方法においては好ましくは、前記の変更が反応温度についての変更である。

【0016】

更に本発明の核酸配列の変異検出方法は、上記の核酸配列の変異検出方法において、前記の複数種類の配列のプローブが、互いに重なり合う配列を有することを特徴とするものである。

【0017】

本発明の核酸配列の変異検出方法はまた、上記の核酸配列の変異検出方法において、前記の複数種類の配列のプローブが、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1種類以上の不完全マッチプローブと、当該完全マッチプローブ及び当該不完全マッチプローブの両端において塩基配列を伸張するか、又は短縮したオーバーラッピングプローブとからなることを特徴とするものである。

【0018】

【発明の実施の形態】

(定義)

本願明細書においては、以下の用語を以下に定義した意味において用いる。

「核酸」とは、DNA、RNA、並びに人工的ヌクレオチドを含むDNA及びRNAの何れをも意味する。

「ハイブリッド」とは、上記の核酸の何れかの間に形成される同種間及び異種間の二重鎖を意味し、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA等が含まれる。

「シグナル」とは、適当な手段により適宜検出・測定可能な信号であって、蛍光、放射能、化学発光等が含まれる。

「カイネティックに行う」とは、データの取得を、ある定められた時点における一定条件下のみではなく、時間的に連続した又は断続した各時点で、適宜測定条件を変更しながら測定を行うことを意味する。

【0019】

以下においては、本発明の実施態様についての、構成、実施方法、効果等について説明する。

一の態様において本発明の核酸配列の変異検出方法は、標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の配列を検出する方法において、当該プローブの配列の種類が複数であり、当該シグナルの測定が、カイネティックなデータ取得により行われることを特徴とする。

【0020】

ここで標的核酸は、ゲノムからのDNA、細胞から抽出されたmRNA、PCRにより増幅されたDNAや、プラスミドDNA等、種々のものとすることが可能であり、プローブとのハイブリダイズに悪影響を及ぼす夾雑物等が含まれていない限り、これは特に限定されるものではない。しかし、精度の高い実験を行うためには、当該技術分野において既知の種々の精製技術により純度をより高めておいた試料を用いることが好ましい。また、標的核酸は、プローブを合成するために、ハイブリダイズを行う部分についての少なくとも一部の配列が既知であることが好ましい。標的核酸への標識の導入は、mRNAの逆転写やPCRにより

行うことができる。

【0021】

標的核酸とプローブとの接触は、他の核酸との間の二重鎖形成を阻害しないようにして固定することが可能な担体上に固定化されたプローブに対して、標的核酸を含む溶液等を接触することにより行うことができる。

【0022】

標的核酸-プローブ間のハイブリッド形成は、標的核酸中のハイブリダイズする部分の配列に依存する条件近辺において行うことができるが、例えばシグナルを測定する条件の変更が、温度の変更である場合には標的核酸のハイブリッド形成部分の配列の T_m に基づいて決定された温度範囲においてカイネティックに行うことができる。即ち、複数種類のプローブのうちもっとも低い T_m 値を有するプローブの T_m 値よりも低い温度から、複数種類のプローブのうちでもっとも高い T_m 値を有するプローブの T_m 値よりも高い温度の間の温度範囲内でカイネティックにシグナルの測定を行うことができる。

【0023】

T_m よりも低いが、 T_m 近傍にある温度においては、標的核酸-プローブ間での特異的な二重鎖形成が生じやすく、非特異的な二重鎖の形成は生じにくいが、ハイブリッドの形成には時間がかかる。一方、このように特異的な二重鎖形成が生じやすい温度よりも更に低い温度においては、二重鎖形成の反応時間は短縮されるが、標的核酸-プローブ間の非特異的な結合量が増大してしまう。従って、ハイブリダイズ反応の温度設定は、要求される実験精度と必要な反応時間との兼ね合いで決定される。また、その他の反応条件についても同様にこれを考慮して決定される。

温度をカイネティックに変化したときの、標的核酸とプローブとの間のハイブリッド状態の変化を図を参照しながら以下に説明する。

【0024】

図1乃至図4は、4種類の配列を検出するための実験系における、ハイブリッド状態の変化を模式的に示したものである。これらの図においては、標的核酸A、B、C、及びDの配列を検出する試みが行われており、標的核酸A、B、C、

及びDのそれぞれの T_m 値(°C) ($T_m(A)$ 、 $T_m(B)$ 、 $T_m(C)$ 、及び $T_m(D)$) の間には、 $T_m(A) < T_m(B) < T_m(C) < T_m(D)$ の関係が存在している。この実験系においては、測定温度を、図5に示されるようなスキームにより、カイネティックに変化させて、各温度において標的核酸の検出を行っている。

【0025】

図1は、図1乃至図4の中でもっとも低い温度である、 $T_m(A)$ 近傍の温度 $T(A')$ でのハイブリッドの状態を示したものであり、標的核酸Aとその完全マッチプローブのハイブリッドのシグナル強度は、標的核酸Aとその一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドとのシグナルの強度よりも強いが、より高い T_m 値を有する標的核酸B、C、及びDを含むハイブリッド由来のシグナル強度よりも弱くなっている。

【0026】

図2は、 $T(A')$ から更に温度を、 $T_m(B)$ 近傍の $T(B')$ にまで上げた状態を示す。この温度においては、標的核酸Bとその完全マッチプローブとのハイブリッドのシグナル強度は、標的核酸Bとその一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドのシグナルの強度よりも強いが、より高い T_m 値を有する標的核酸C、及びDを含むハイブリッド由来のシグナル強度よりも弱くなっている。更にこの温度においては、標的核酸Aとその完全マッチプローブとのハイブリッドのシグナルは、検出されているが、標的核酸Aとその一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドのシグナルは、ほぼ検出されていない。

【0027】

次に図3は、 $T(B')$ から更に温度を、 $T_m(C)$ 近傍の $T(C')$ にまで上げた状態を示す。この温度においては、標的核酸Cとその完全マッチプローブとのハイブリッドのシグナル強度は、標的核酸Cとその一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドのシグナルの強度よりも強くなっている。更にこの温度においては、標的核酸A、Bとそれぞれの完全マッチプローブとのハイブリッドのシ

ゲナルは、それぞれ検出されているが、特に標的核酸Aについては、図1と比較して弱まっており、標的核酸A及びBと、それぞれの一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドのシグナルは、ほぼ検出されていない。

【0028】

次に図4は、T(C')から更に温度を、Tm(D)近傍のT(D')にまで上げた状態を示す。この温度においては、標的核酸Dとその完全マッチプローブとのハイブリッドのシグナル強度は、標的核酸Dとその一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドのシグナルの強度よりも強くなっている。更にこの温度においては、標的核酸B、及びCとそれぞれの完全マッチプローブとのハイブリッドのシグナルは、検出されているものの、特に標的核酸Bについては、図2と比較して弱まっており、標的核酸Aを含むハイブリッド、並びに標的核酸B及びCとそれぞれの一塩基ミスマッチプローブとのハイブリッドは、ほぼ検出されていない。

【0029】

ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルの測定は、通常、試料となる（標的）核酸に予め導入しておいた標識を用いて行われるが、例えば蛍光標識した試料核酸や、放射性同位元素を含むdNTPから合成した試料核酸等を使用することができる。標識の導入については、種々の核酸標識技術（既存のもの、新規に開発されるものを問わない）を使用することが可能である。更に、ハイブリッド二重鎖に結合する試薬をハイブリッド形成後に添加し、それを検出することによりハイブリッドを検出することも可能である。

【0030】

ハイブリッドの検出を蛍光により行う場合の例としては、PCRにより試料核酸を合成する際に、予めプライマーに蛍光標識を導入しておいたものを利用する方法や、試料核酸に対して、化学反応や酵素を利用して蛍光標識を導入する方法が挙げられる。蛍光標識の導入に関しては、一般的に用いられている標識方法を利用することができる。

【0031】

使用可能な蛍光標識としては、FITC、ローダミン、Cy3、Cy5、テキ

サスレッドなどを挙げることができるが、これ以外のものも利用することが可能である。

【0032】

シグナルのデータ取得は、時間に関して定点ではなく、一例が図5に示されるようにカイネティックに行う。より具体的には、カイネティックにデータ取得する時間は、ハイブリッド形成反応の反応条件に応じて異なるものであるが、概しる時間は、ハイブリッド形成反応開始後、合計で数分間から数時間程度にわたる。もつとも、反応条件いかんによっては、この範囲外の合計時間だけデータ取得を行うことも可能である。図5に示される例では、温度上昇は、階段状に、断続的に行われているが、連続的に上昇させたり、逆に下降させることも可能である。

【0033】

標的核酸-プローブ間のハイブリッド形成は通常、配列情報に基づいた推定の最適条件において行われるものである。従ってその条件が本当に最適条件であるかはわからないのが普通である。そのために、静的（非カイネティック）に、又は定點的に測定を行う従来の核酸情報検出方法においては、最適ではない条件下でのデータ取得を行っている場合には、データの信頼性が十分ではなかったり、データのばらつきが存在したりするなどの問題が存在していた。

【0034】

しかし、本発明においては、カイネティックなデータ取得と連動して反応条件を変更することにより、複数の反応条件でハイブリダイズ反応を進行させ、それを経時的に測定することが可能となる。従って、例えばT_m値など、配列固有の特性値が異なる複数種類のプローブを使用する場合であっても、カイネティックなデータ取得を行う際に、その特性値の範囲を考慮して実験を行えば、同一系内において、同一核酸中の複数の配列の検出や、複数種類の標的核酸の検出をほぼ同時にを行うことが可能となる。

【0035】

このように、本発明の一態様においては、従来の時間に関しての定点観測に基づく静的なデータ取得とは異なり、データ取得がカイネティックに行われ、尚且複数のプローブを使用していることに起因して、T_m値の異なる複数の配列を

同一系内において、精度よく尚且つ高速に検出することが可能となっている。

【0036】

上記の実施態様においては、前記のシグナルのデータ取得が、反応系の測定温度を変更しながら行われる例を挙げたが、反応温度以外にも反応溶液の組成、容量、又は種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行うことも可能である。

【0037】

ここで「反応温度の変更」とは、標的核酸とプローブ間でのハイブリダイズ反応が行われる系内の温度を変更することを意味し、「反応溶液の組成の変更」とは、反応溶液に含まれる塩や添加物等の組成やpHを変更することを意味し、「反応溶液の容量の変更」とは、反応系からの反応溶液の抜き差しによる容量の変化を意味し、そして「反応溶液の種類の変更」とは、水溶液やアルコール溶液といった種類を変更することを意味する。

【0038】

本発明においては更に、シグナルのデータ取得を反応条件の変更と連動させながら行うに際して、ハイブリダイズ反応の反応変化量、反応の立ち上がり、反応条件の変化に対する反応系の応答具合等の情報についても併せて取得しながら実験を行うことが可能であり、これは配列のT_m値等が事前に正確にわからない場合などにおいて、測定を正確に行えるという点で有益である。

【0039】

本発明の核酸配列の変異検出方法一の態様においては、前記の複数種類の配列のプローブが互いに、重なり合う配列を有することを特徴とする。

【0040】

この態様の方法においては、標的核酸中の同一の配列を複数種類のプローブで検出する。これらの複数種類のプローブは何れも、標的核酸中の認識配列を共有し、即ち認識配列に重なりが生じていて、尚且つ少なくとも1塩基分だけ、他のプローブとは異なる塩基とハイブリダイズするものとなっている。

【0041】

同一の標的核酸に対し、このような複数種類のプローブを使用することにより、変異をより正確に検出することが可能となる。プローブは、その配列及び長さ

、そして使用条件によっては高次構造をとるなどして、標的核酸とのハイブリダイズがうまくいかないことがあり、そのようなプローブのみを使用して標的核酸の検出を行えば、偽陽性・偽陰性の問題が生じることがある。しかしながら、複数種類のプローブを利用すれば、少なくともその1種類のプローブが正常に標的核酸とハイブリダイズしている確率がより高いことが期待され、よって検出結果の信頼性を高めることが可能となる。

【0042】

より具体的には、前記の複数種類の配列のプローブに、
標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ
、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1種類以上の不完全
マッチプローブと、

当該完全マッチプローブ及び当該不完全マッチプローブの両端において塩基配
列を伸張するか、又は短縮したオーバーラッピングプローブと
からなるものを利用すると、より正確な測定（変異の判定）が可能となる。

【0043】

好みしくは、長さの短いプローブと、長さのより長いプローブとの間のT_m値
の差を、5乃至10℃設ける。そしてこれらのプローブを同一系内で使用してカ
イネティックに測定を行う。プローブ間のT_m値の差異が5乃至10℃である場
合には、より長いプローブのT_m値近傍の温度においても、短いプローブの完全
マッチのスポットからのシグナルが期待できるためである。

【0044】

本発明のより具体的な態様としては、標的核酸がDNAである場合が挙げられ
る。この場合には、本発明の実施にはいわゆるDNAチップや、DNAマイクロ
アレイを使用することができる。

【0045】

本願発明の核酸の変異検出方法において使用できるDNAマイクロアレイ・D
NAチップについては特に限定されるものではなく、通常のマイクロアレイ等を
利用することができる。使用可能なマイクロアレイの一例としては、複数のマイ
クロアレイがスライドチップ上に設けられたものであって、各マイクロアレイ中

に、複数のプローブスポットが存在するものを挙げることができる。ここで、プローブスポットとは、プローブを固定するための最小単位のことである。

【0046】

スライドチップの大きさは、通常は0.5-20.0cm X 0.5-20.0cm X 0.01-1.0cmの範囲である。また、マイクロアレイの大きさは、通常は3.0mm²-16cm²の範囲にある。更に、プローブスポットは、略円形、略矩形、又は多角形とすることができます、その直径又は一辺の長さは、通常、100乃至数百μm程度である。また、1マイクロアレイ中のプローブスポットの数は、10-1000の範囲にあることが通常である。実験条件に応じて、ここに定義した範囲以外の規格のDNAマイクロアレイを使用することも勿論可能である。

【0047】

本願発明の核酸配列の変異検出方法により検出可能な標的核酸は、特に限定されるものではないが、非限定的な例としては、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、及びアポトーシス関連遺伝子等を挙げることができる。

【0048】

【実施例】

(実施例1)

本発明の系を実証するために、配列の長さを変化させてTm値を異ならせた複数種類のプローブを用いて、K-rasガン遺伝子のコドン12における変異の有無の決定を行う方法の概略を以下に示す。

マイクロアレイ上に、K-rasコドン12の配列に突然変異を導入した7種類の20量体のK-rasガン遺伝子プローブのセンス鎖（配列番号1-7）と、アンチセンス鎖（配列番号8-14）、及びこれらのプローブの両端から1又は2塩基を削除した、同じく7種類の17量体のK-rasガン遺伝子プローブのセンス鎖（配列番号15-21）、及びアンチセンス鎖（配列番号22-28）を図6に示される配置でスポットした。

20量体のプローブ群のTm値は、56乃至58℃であり、一方、17量体のプローブ群のTm値は、47乃至49度であり、20量体のものに比べて低い。こ

のマイクロアレイの各プローブと、標的核酸である、蛍光標識K-rasガン遺伝子 (K-rasコドン1-2を増幅するプライマーを利用してPCRによって増幅しておいたもの)との間で、ハイブリダイゼーションさせ、ハイブリッドから発せられる蛍光の強度をオリンパス光学社製BX-52TRFに冷却CCDカメラを接続した実験システムで測定した。

【0049】

上記に概略が示された実験は、

- 1) 蛍光標識試料の調製
- 2) マイクロアレイの作製
- 3) 試料のマイクロアレイに対するハイブリダイゼーション
- 4) データの解析

の主として4つのステップから構成されるものであるが、以下には、各ステップの詳細を説明する。

【0050】

1) 試料の調製について

対象となる遺伝子セットの増幅と、蛍光標識を行う。対象遺伝子の採取源としては、例えば人体の一部などを挙げることができるが、より具体的にはがん化した組織などから採取した組織切片や、マイクロダイセクション法等によって得られた細胞片や、培養細胞などが挙げられる。本実施例においては、ヒトK-rasガン遺伝子テンプレートセット（宝酒造社製、Cat# 7242）を使用した。7種類のテンプレートに対して、同じくK-rasガン遺伝子のコドン1-2の部分を増幅できるPCRキット（宝酒造社製、Cat# 7112）を用いて遺伝子増幅した。増幅時には、5'末端にFITCの蛍光標識が入れられたプライマーを使用した。PCR終了後、3%NuSieve (FMC) で作製したアガロース電気泳動を行い、増幅産物を確認した。

【0051】

2) マイクロアレイの作製

K-rasガン遺伝子の塩基配列は、GenBank等のデータベースを参照し、配列番号1-7、8-14、15-21、22-28のプローブをマイクロアレイに固相化し

た。合成したプローブをマイクロアレイに対し、図6のレイアウトとなるようにピエゾ素子を利用した微量分注システムを利用してスポットした。図6のスポット1においては、配列番号1のK-ras天然配列(Wt)に対応する20量体のセンス鎖プローブが配置されている。スポット2においては、配列番号2のK-rasArg変異体に対応する20量体のセンス鎖プローブが配置され、スポット3においては、配列番号3のK-rasCys変異体に対応する20量体のセンス鎖のプローブが配置されている。また、スポット8においては、配列番号8のK-rasWtに対応する20量体のアンチセンス鎖プローブが配置され、スポット15においては、配列番号15のK-rasWtに対応する17量体のセンス鎖プローブが配置されている。また、スポット22においては、配列番号22のK-rasWtに対応する17量体のアンチセンス鎖プローブが配置されている。

【0052】

3) ハイブリダイゼーション

PCR後の試料40μlに、ハイブリダイゼーション用溶液として、10μlの1.25XSSPE（リン酸ナトリウム緩衝液、参考資料：DNAマイクロアレイと最新PCR法、細胞工学別冊ゲノムサイエンスシリーズ1、秀潤社）を添加して、ハイブリダイゼーション試料を作成した。ハイブリダイゼーションの分析は、オリンパス光学社製のBX-52TRFに冷却CCDカメラを接続した実験システムによって行った。この実験システムは、反応フィルタの周りの溶液駆動と、温度制御、及び蛍光スポットの画像の記録を自動的に行うことが出来るように設計されている。直径6mmのマイクロアレイが設置された専用チャンバーの反応部分に、50μlの反応溶液を加え、溶液駆動と温度変化を与えて、蛍光画像を撮像した。

【0053】

テンプレート由来の蛍光標識試料を用いて得られた実験結果を以下に示す。対照試料としては、正常なK-rasガン遺伝子配列を持つPCR産物を使用した。ハイブリダイゼーション時に、温度変化を与えて場合に得られたマイクロアレイの蛍光スポットの時間変化を図7から9において示した。この実験システムは、溶液駆動を伴い、且つ溶液の温度変化を与えるようにプログラムした。温度に関しては、最初に室温(25℃)であった反応チャンバーが55℃になり、更に最終的には、

には72℃となるように設定してある。図からも明らかなように、反応後すぐにほとんどのスポットの蛍光強度が上昇した。この温度環境では、固相化された17量体群、及び20量体群とともに、7種類の異なる塩基配列を持つプローブの中で、試料に対して完全に配列の一致したプローブ以外のスポットでも強い蛍光強度が見える（図7）。更に反応チャンバーの温度を55度に上げることにより、17量体群のプローブにおいて、次第にミスマッチのスポット（スポット16-21、及び23-28）の蛍光強度は減少し、実際に標的核酸に対して完全マッチであるGly（コドン12の配列GGT）の蛍光スポット（15及び22）のみが観察されるようになる（図8）。しかし、20量体群の各プローブはまだ、プローブの持つT_m値以下であり、シグナルの強さと完全マッチは一致していない。更に温度を72℃に上げることにより、20量体群でもミスマッチ個所のスポットの蛍光強度が減少し、完全マッチであるGly（コドン12の配列GGT）の蛍光スポット（スポット1と8）のみが観察されるようになる（図9）。この一連の画像を温度条件などの情報とともにハードディスクに保存した。

【0054】

4) データの解析

得られた画像を変異検出用にプログラムした解析ソフトウェアを利用して解析した。実験の結果得られた蛍光画像情報を元にして、標的核酸とプローブとの間のT_m値とアフィニティの程度を決定することができる。この結果、3)の実験から、試料のK-rasコドン12部分のプローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの程度が、環境要因によって変化し、ある温度条件下では、ミスマッチプローブのほうが完全にマッチしたプローブよりも高いアフィニティを持つことがわかったまたプローブと試料との間のアフィニティは、ミスマッチの塩基配列によって異なることが画像からも直感的に理解することもできる。このようにして一つの反応アレイによって試料と複数のプローブとの間のリアルタイムなアフィニティ解析とハイブリダイゼーションのモニタリングが行えることが示された。この実験システムを使用して実際のT_m値を求めることができるとともに、DNAの二重らせんの安定性についての新しい知見が得られることが期待された。実際にさまざまな突然変異を有するプローブへの親和性を解析したり、プロモータ部分の

転写効率を測定することによって、より正確なハイブリダイゼーションの機構の解析に利用することができる。

【0055】

(実施例2)

本発明に基づいて行ったp53ガン抑制遺伝子のコドン237と、K-rasガン遺伝子のコドン12を、同時に検査する実験ステップについて記載する。実験ステップは、

- 1) 蛍光標識試料の調製
- 2) マイクロアレイの作製
- 3) DNAチップに対するハイブリダイゼーション
- 4) データ解析

の4つのステップから構成されている。

【0056】

1) 蛍光標識試料の調製

対象遺伝子セットの増幅と、蛍光標識をまず行う。試料としては、正常なヒトの口腔内から採取した扁平上皮細胞を用いた。1MのNaClを溶解した食塩水で数回うがいをしたあと、PBSによってもう一度よくうがいをしたものを細胞片の浮遊液とした。この細胞浮遊液を2000 rpm×10分間の遠心によって沈殿させ、0.2 μg/mlのプロテアーゼK (Wako社製) と、0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含有するPBS中に懸濁した。試料の入った細胞溶解液を37°Cで30分間反応させた後、95°Cで30分間熱処理を行い、プロテアーゼKを失活させた。反応後の試料を1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、12,000×2分間の遠心分離を行って、溶解しなかった細胞片を沈殿させた。この遠心分離の上清を核酸の抽出液として用いた。得られた核酸抽出液をPCRマスター・ミックスに懸濁し、50サイクルのPCR反応を行った。マスター・ミックスは、宝酒造社製のPCRコアキット1と、K-rasコドン12を増幅するプライマー及びp53コドン237を増幅するプライマー対を用いて、キットの説明書に従つて調製した。PCRの終了後に、3% NuSieve (FMC社製) で調製したアガロース電気泳動を行って、増幅産物を確認した。更に核酸の蛍光標識を増強するために、得

られた増幅試料を再度、非対称PCR法で処理した。非対称PCR法は、第一のPCR法からのセンス鎖のプライマーを削除した組成、温度サイクルから構成されている。非対称PCR法を行った試料に10%の3M酢酸アンモニウムを添加し、更に70%濃度となるようにエタノール（Wako社製）を添加した。-20℃で一昼夜静置して、12,000 rpm×2分間の遠心によってPCR産物を沈殿させた。沈殿を2回、70%エタノールで洗浄し、SpeedVac（Savant社製）で乾燥させた。

【0057】

2) マイクロアレイの作製

p53とK-rasガン遺伝子の検出用チップに使用したプローブの塩基配列は、GenBankなどのデータベースを参照とした。合成したプローブ（配列番号1-7、8-14、29-36）を、図10のレイアウトとなるようにピエゾ素子を利用した微量分注システムを利用したスポットした。図10においては、スポット1-7にはそれぞれK-rasのセンス鎖プローブである配列番号1-7のプローブを配置し、スポット8-14には、それぞれK-ras検出用のアンチセンス鎖プローブである配列番号8-14のプローブを配置し、スポット29-32にはそれぞれp53検出用のセンス鎖プローブである配列番号29-32のプローブを配置し、スポット33-36にはそれぞれp53検出用のアンチセンス鎖プローブである配列番号33-36のプローブを配置した。

【0058】

3) ハイブリダイゼーション

乾燥させたエタノール沈殿物に50μlの純水を加えてよく溶解し、蛍光標識試料とした。ハイブリダイゼーションの試料溶液として、3XSSPE、10%（v/v）ExpressHyb（Clontech社製）に、10%溶液となるように懸濁した。ハイブリダイゼーションの分析は、オリンパス光学社製のBX-52TRFに冷却CCDカメラを接続した上記の実験システムによって行った。

【0059】

解析結果

正常なヒトより採取した試料を用いて行った実験結果の一部を示す。実験装置によって得られたDNAチップの蛍光スポットの時間変化が図11乃至13において

て示されている。これらは、室温（25℃）での反応直後、55℃、72℃における各スポットの傾向強度の測定結果である。この実験システムは、溶液駆動を伴い、且つ溶液の温度変化を与えるようにプログラムした。温度に関しては、最初に室温（25℃）であった反応チャンバーが、55℃になり、更に最終的には72℃になるように設定してある。図11からも明らかなように、反応後すぐにほとんどのスポットの蛍光輝度が上昇し、更に温度を55℃に上げるに従って、図10の下部に位置する部分にスポットしたp53のプローブ群の中で完全マッチのセンスプローブとアンチセンスプローブの2スポットのみが強い蛍光強度を示すようになった（図12）。この状態では、固相化されたプローブに対するK-ras遺伝子のTm値が高いために、ほとんどのK-rasにおける蛍光スポット輝度の強弱は明瞭でない。そこで、更に反応チャンバーの温度を72℃にまで上げることにより、K-ras遺伝子のスポット輝度の濃淡が明瞭に測定することができるようになった（図13）。一連の画像を温度条件などの情報とともにハードディスクに保存した。

【0060】

4) 解析

得られた画像を変異検出専用にプログラムした解析ソフトウェアを利用して解析した。解析ソフトウェアは、使用したマイクロアレイにスポットしたプローブの塩基配列と、実験の結果得られた画像情報をもとにして試料の塩基配列を自動的に決定することができるものである。3)の結果得られた画像を解析したところ、試料のp53エクソン7の塩基配列は、配列番号31又は35に示されるとおりであることが判明した。また、K-rasコドン12を含む塩基配列は、配列番号17又は24に示されるとおりであることがわかった。これから試料の塩基配列は、p53、K-rasともに正常であることがわかった。このようにして、一つの反応アレイによって二つの遺伝子の配列を迅速に解析することが可能であることが示された。

【0061】

【発明の効果】

本発明によれば、シグナルのデータ取得がカイネティックに行われ、尚且つ複

数のプローブを使用しているため、標的核酸の特性（Tm値等）の異なる複数の配列を同一系内において、精度よく尚且つ高速に検出することが可能となる。また、使用する複数のプローブの配列に重なりを持たせることにより、一塩基の変異の検出精度を上げることが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Olympus Optical Co., Ltd.

<120> A Method for Detecting a Mutation in a Nucleic Acid Sequence

<130> 02P01398

<160> 36

<210> SEQ ID NO:1

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

gttggagctg gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:2

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

gttggagctc gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:3

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3

gttggagctt gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:4

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4

gttggagcta gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:5

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

gttggagctg ctggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:6

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

gttggagctg atggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:7

<211> 20

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 7

gttggagctg ttggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:8

<211> 20

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 8

cctacgccac cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:9

<211> 20

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 9

cctacgccac gagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:10

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 10

cctacgccac aagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:11

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 11

cctacgccac tagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:12

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 12

cctacgccag cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:13

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 13

cctacgccat cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:14

<211> 20

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 14

cctacgccaa cagctccaaac 20

<210> SEQ ID NO:15

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 15

ttggagctgg tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:16

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 16

ttggagctcg tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:17

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 17

ttggagcttg tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:18

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 18

ttggagcttag tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:19

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 19

ttggagctgc tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:20

<211> 17

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> 20

ttggagctga tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:21

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 21

ttggagctgt tggcgta 17

<210> SEQ ID NO:22

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 22

tacgccacca gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:23

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 23

tacgccacga gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:24

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 24

tacgccacaa gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:25

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 25

tacgccacta gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:26

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 26

tacgccagca gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:27

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 27

tacgccatca gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:28

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 28

tacgccaaca gctccaa 17

<210> SEQ ID NO:29

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 29

acaactacat gtgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:30

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 30

acaactacat ctgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:31

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 31

acaactacat atgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:32

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 32

acaactacat ttgttaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:33

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 33

aactgttaca catgttagttg t 21

<210> SEQ ID NO:34

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 34

aactgttaca gatgttagttg t 21

<210> SEQ ID NO:35

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 35

aactgttaca tatgtatgtt t 21

<210> SEQ ID NO:36

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 36

aactgttaca aatgtatgtt t 21

【図面の簡単な説明】

【図1】 プローブA-Dを使用した系において、温度T (A') でのハイブリッドからのシグナルの差を示したものである。

【図2】 プローブA-Dを使用した系において、温度T (B') でのハイブリッドからのシグナルの差を示したものである。

【図3】 プローブA-Dを使用した系において、温度T (C') でのハイブリッドからのシグナルの差を示したものである。

【図4】 プローブA-Dを使用した系において、温度T (D') でのハイブリッドからのシグナルの差を示したものである。

【図5】 データのカイネティックな取得の際の温度変化のプロファイルを示すものである。

【図6】 実施例1において使用したDNAマイクロアレイにおけるプローブのスポット配置図である。

【図7】 実施例1において、室温 (25°C) でハイブリッド形成させたときの、各スポットのシグナル強度を比較したものである。

【図8】 実施例1において、55°Cでハイブリッド形成させたときの、各スポットのシグナル強度を比較したものである。

【図9】 実施例1において、72°Cでハイブリッド形成させたときの、各

スポットのシグナル強度を比較したものである。

【図10】実施例2において使用したDNAマイクロアレイにおけるプローブのスポット配置図である。

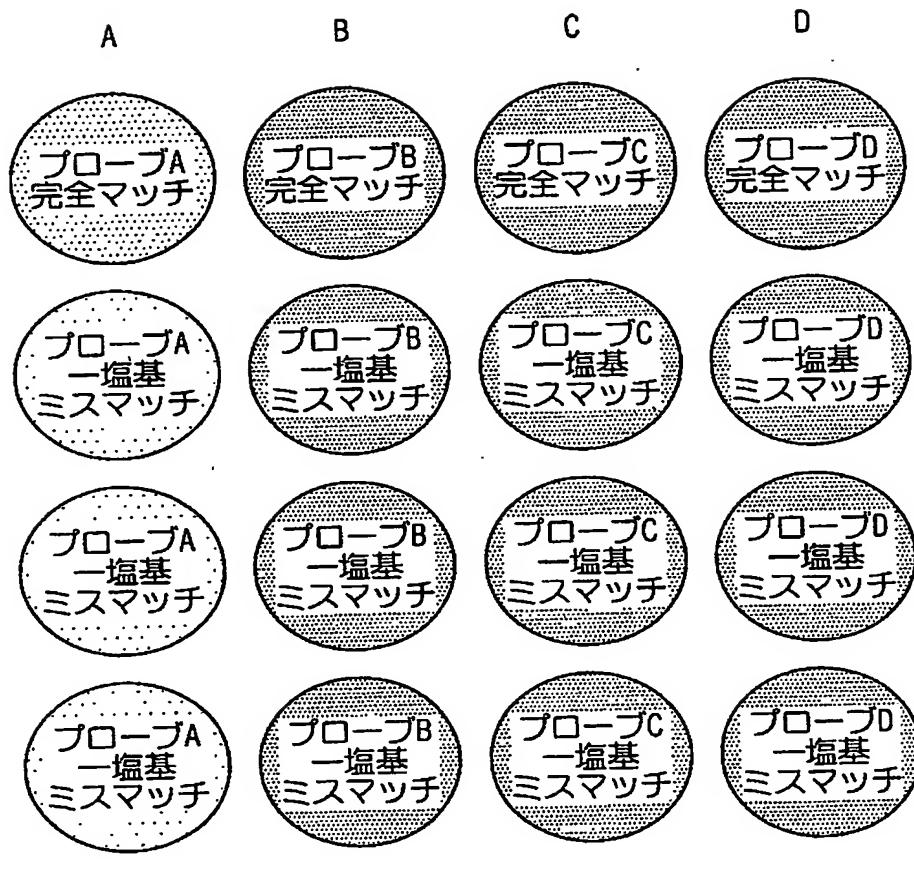
【図11】実施例2において、室温（25℃）でハイブリッド形成させたときの、各スポットのシグナル強度を比較したものである。

【図12】実施例2において、55℃でハイブリッド形成させたときの、各スポットのシグナル強度を比較したものである。

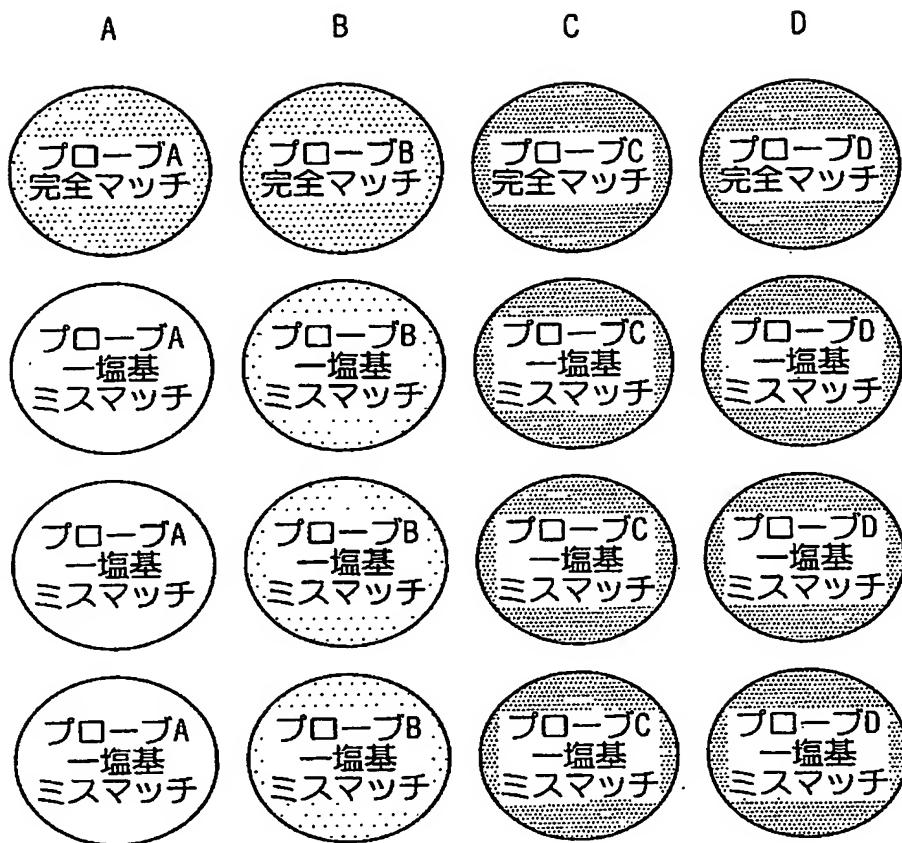
【図13】実施例2において、72℃でハイブリッド形成させたときの、各スポットのシグナル強度を比較したものである。

【書類名】 図面

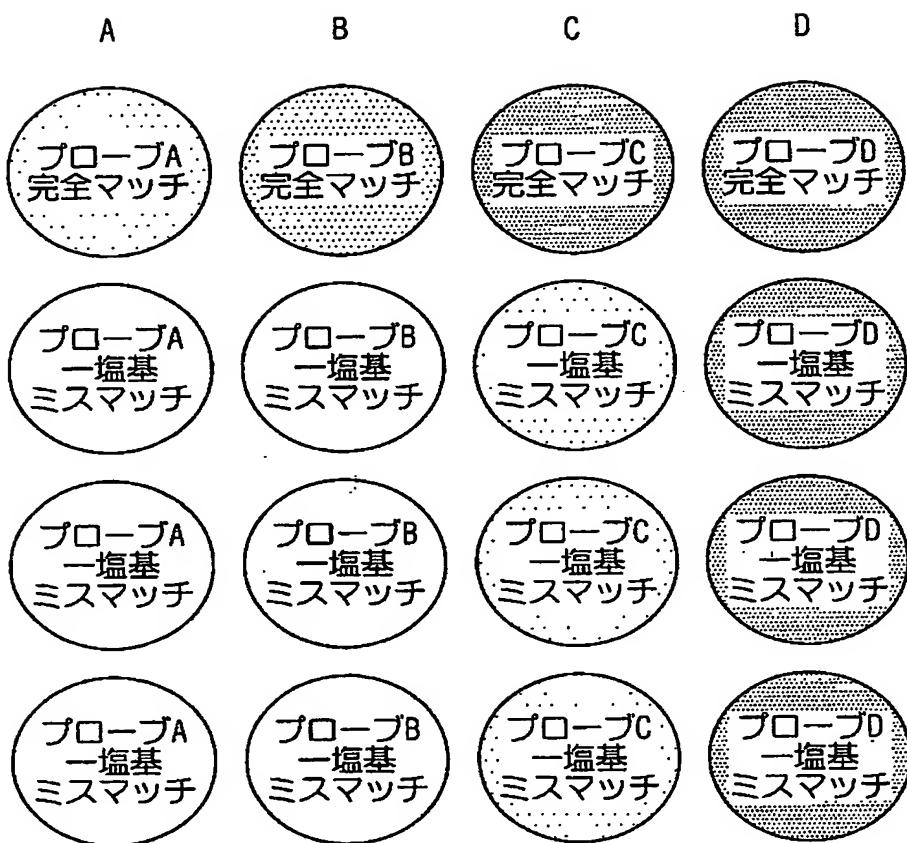
【図1】



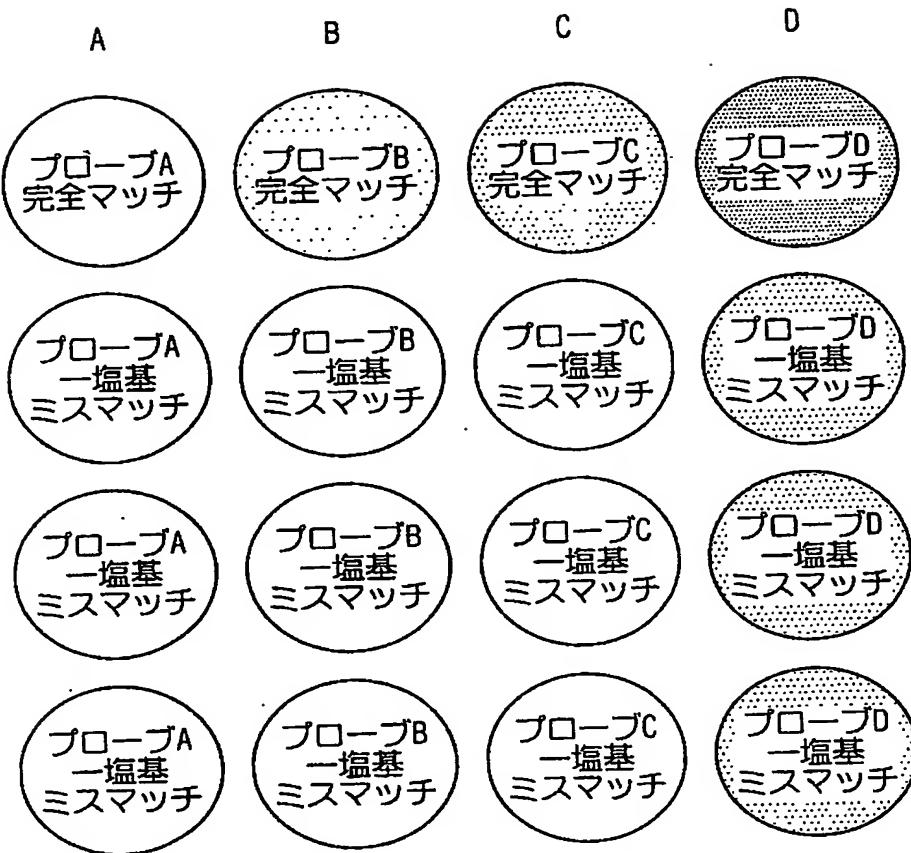
【図2】



【図3】

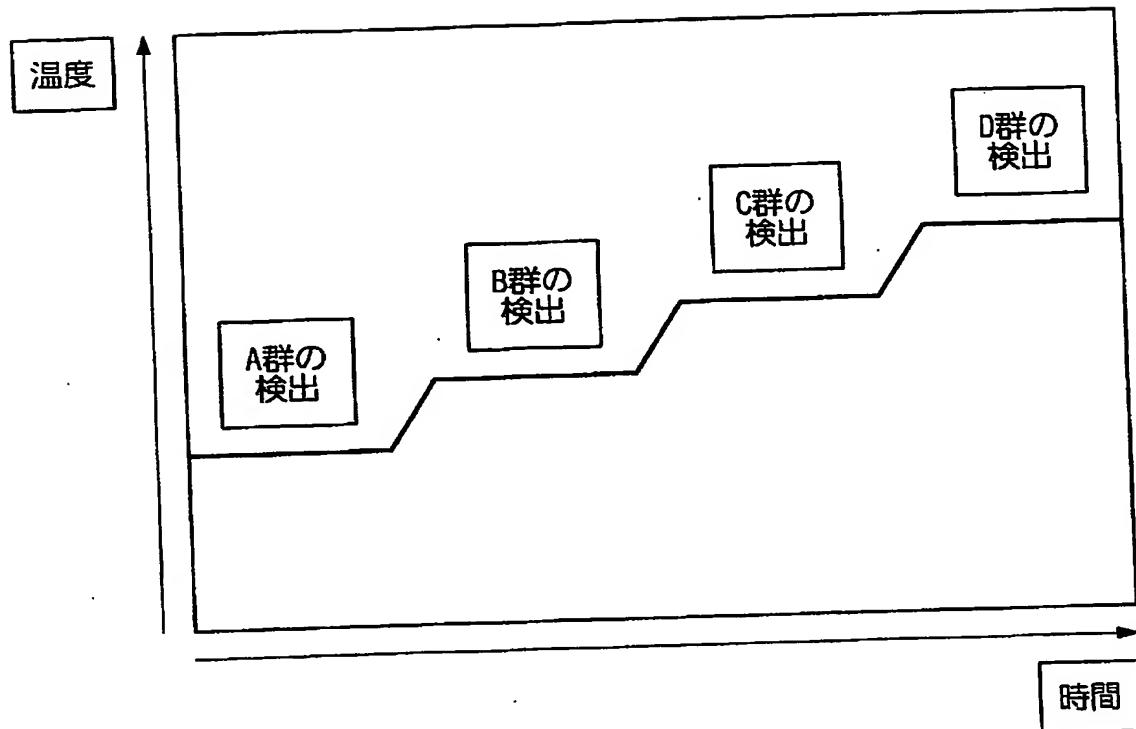


【図4】



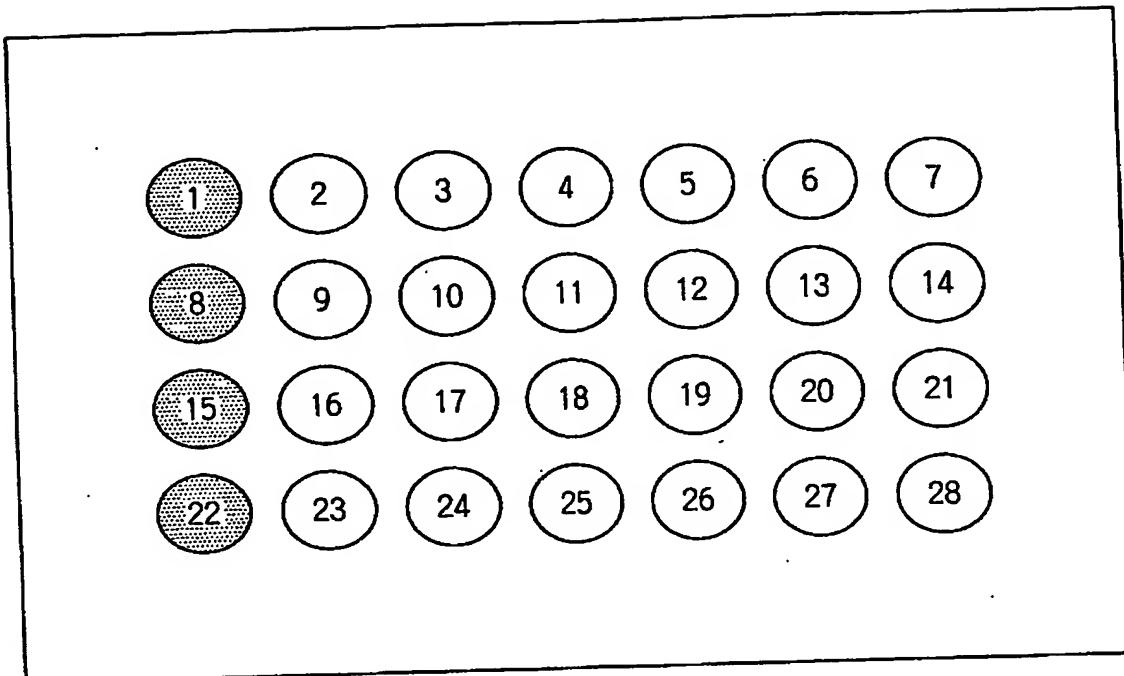
温度T(D')

【図5】

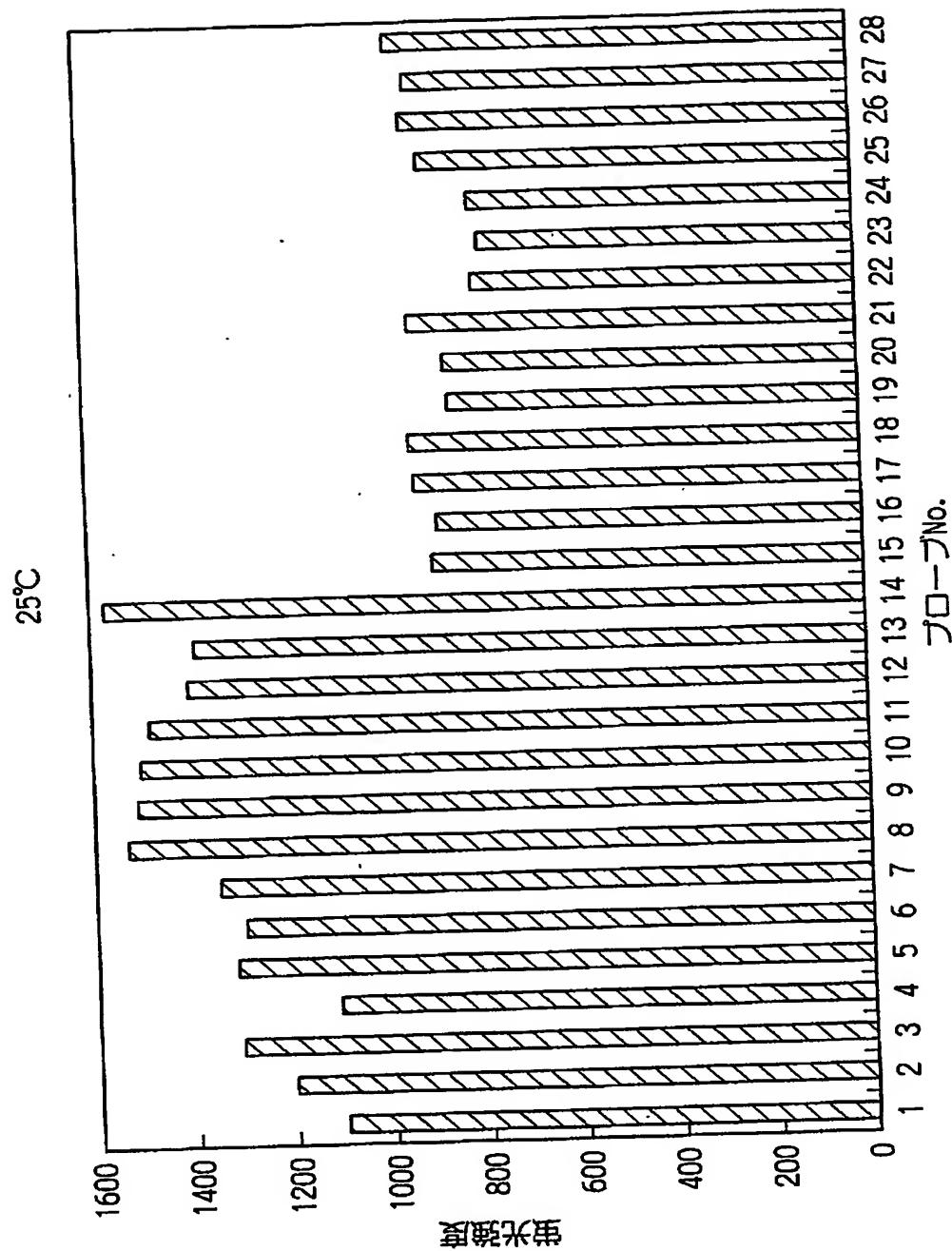


特2002-247023

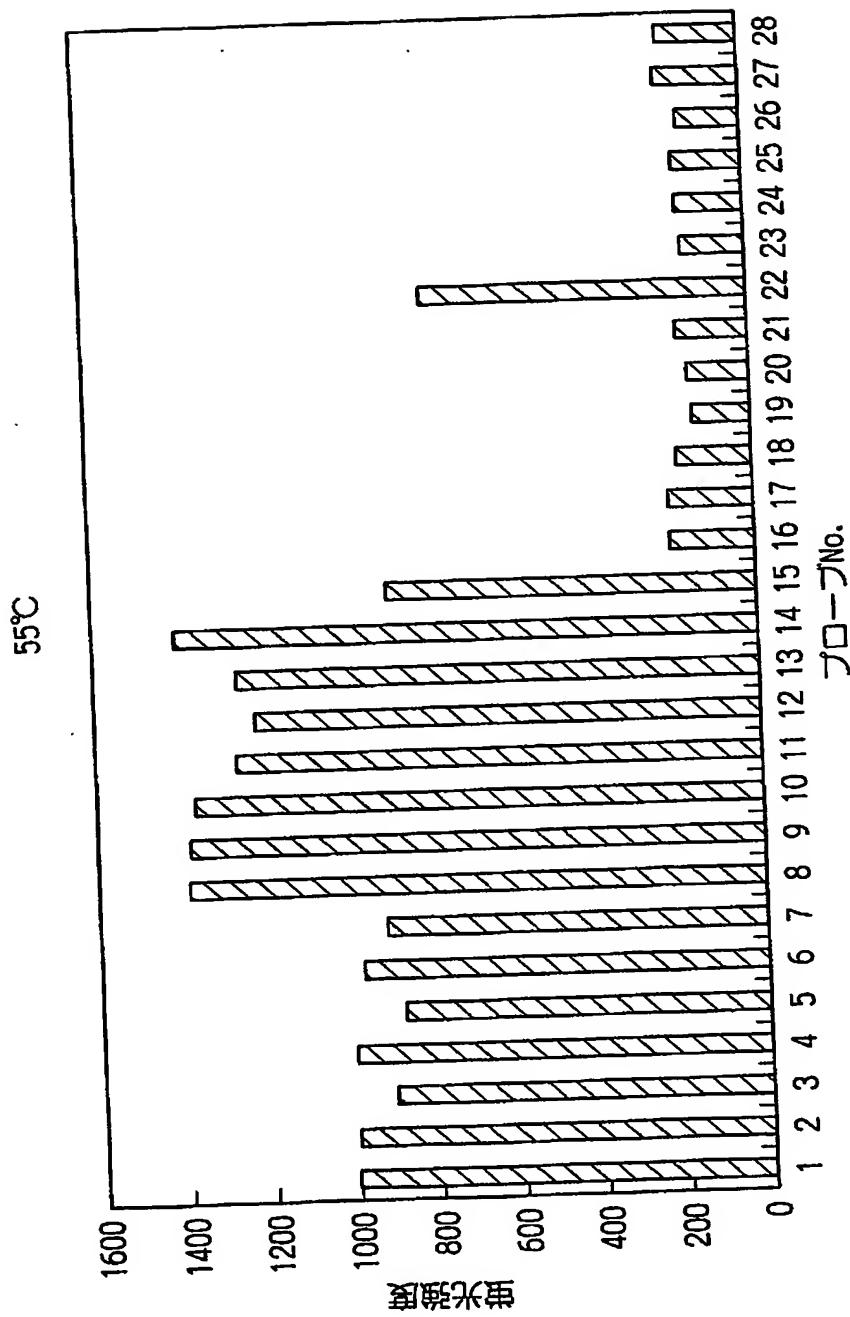
【図6】



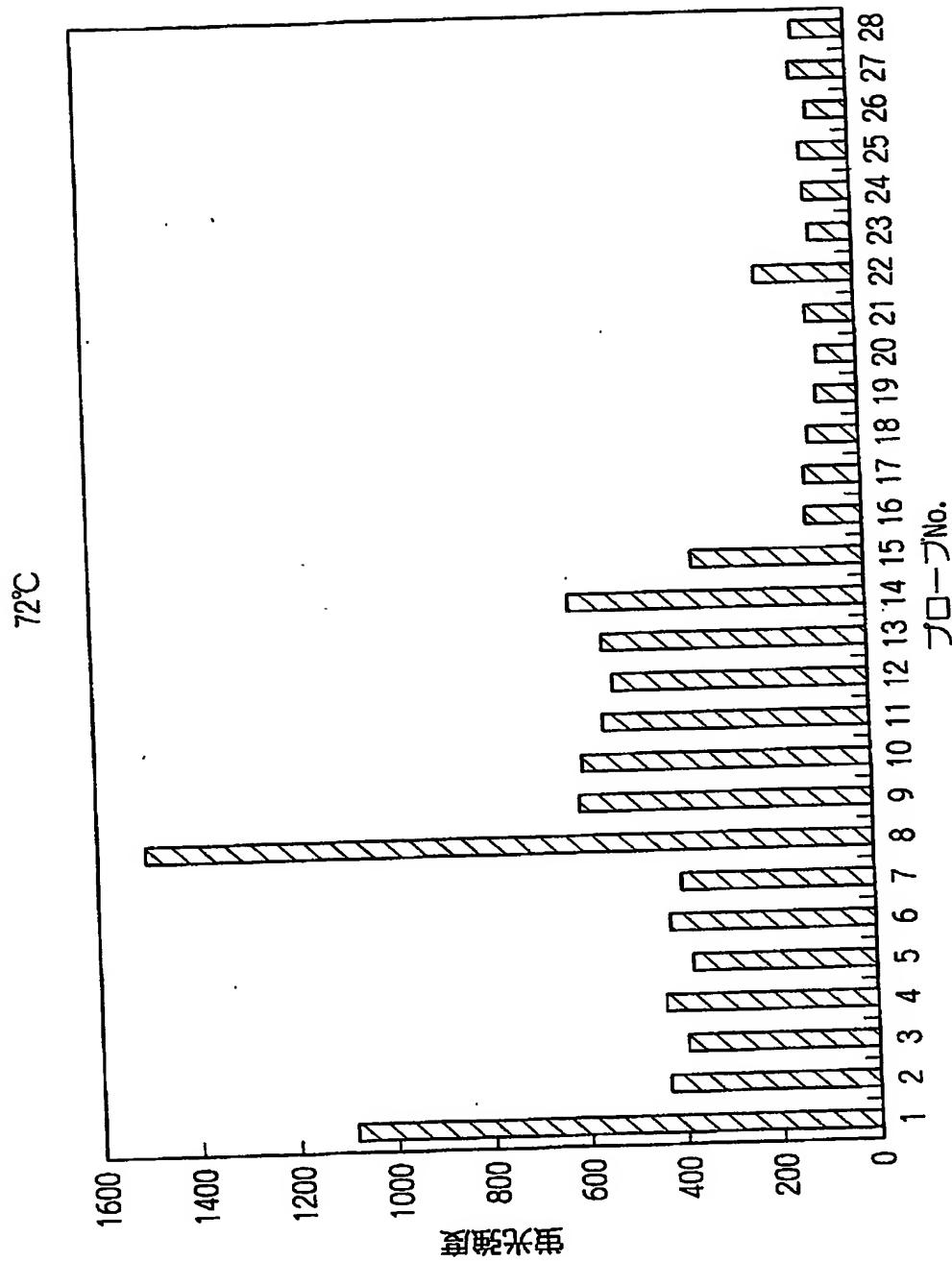
【図7】



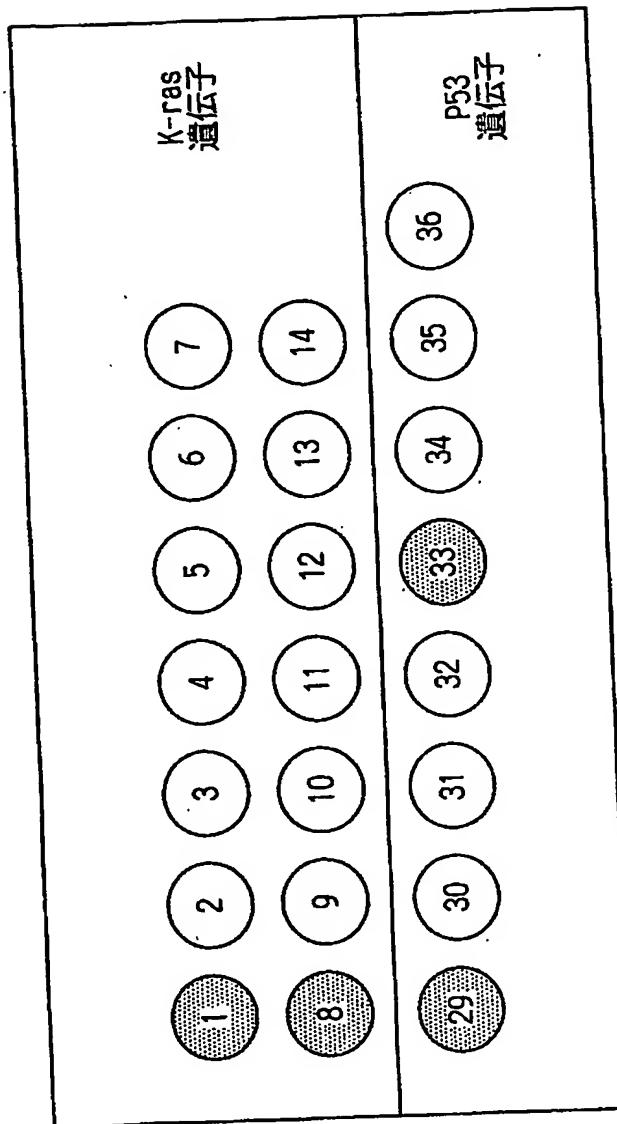
【図8】



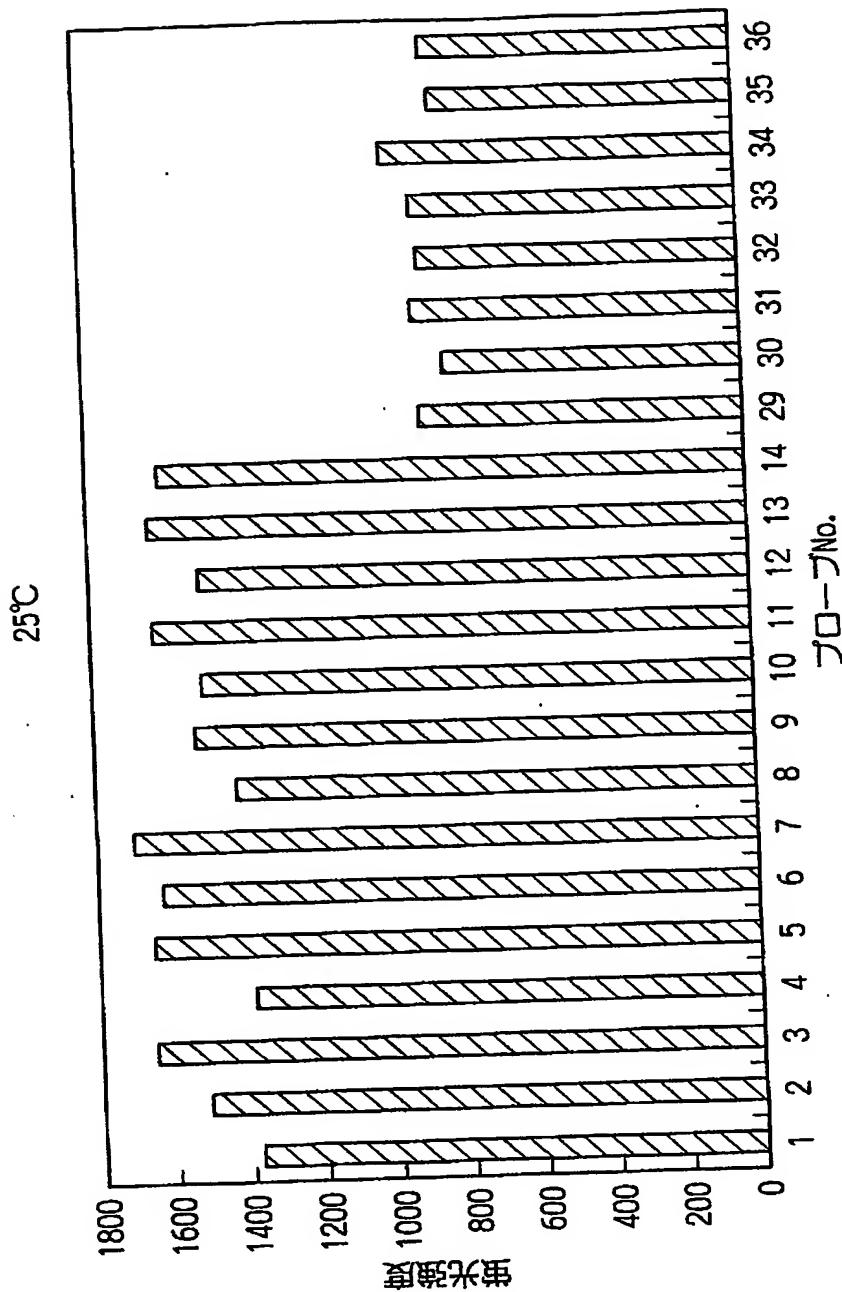
【図9】



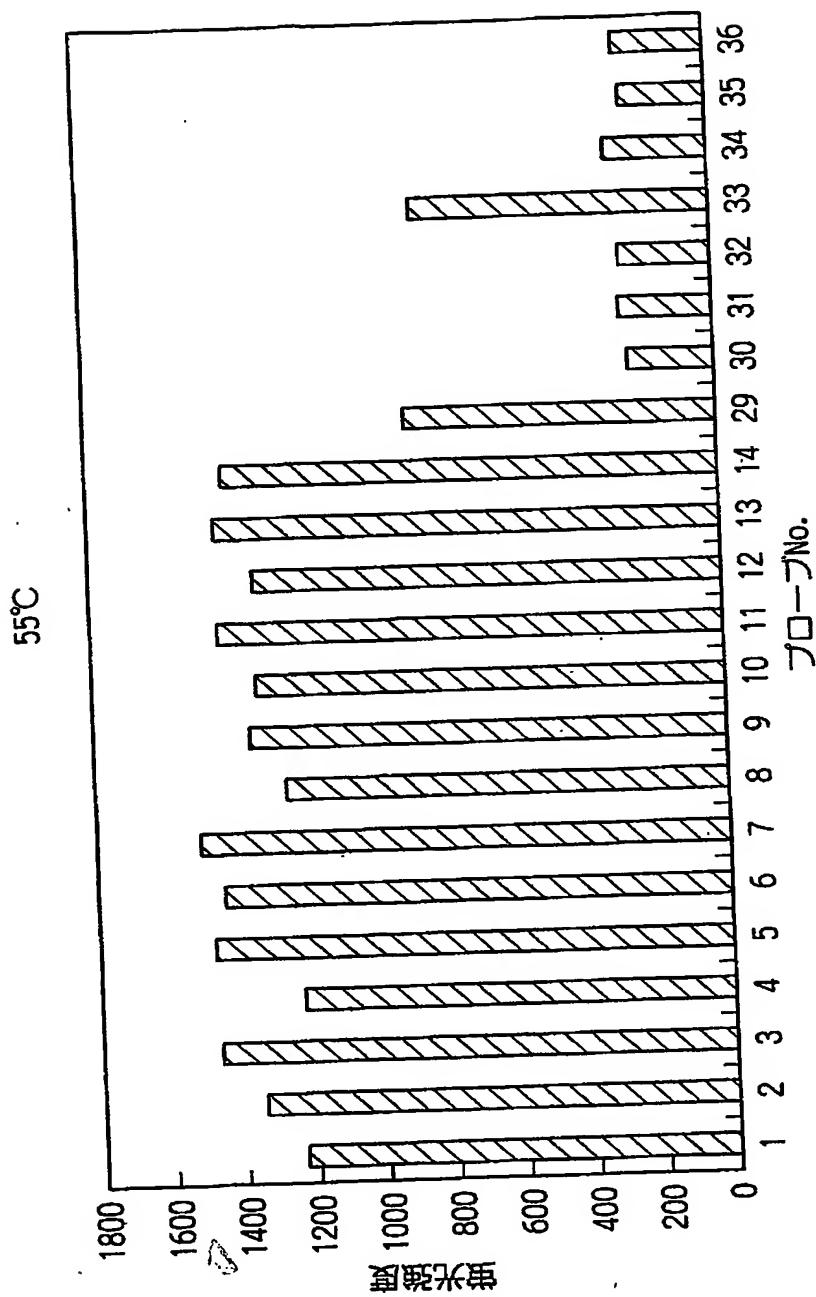
【図10】



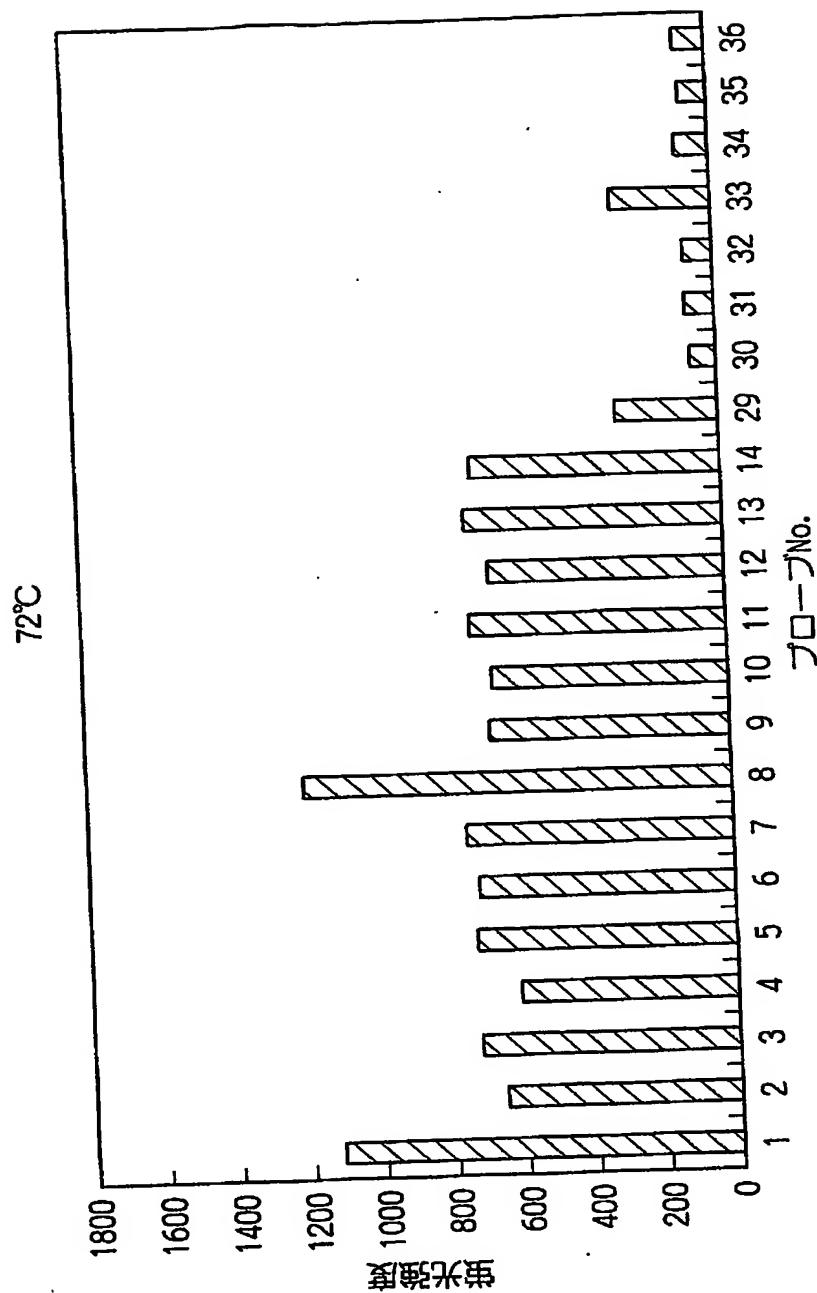
【図11】



【図12】



【図13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標的核酸の複数種類の配列についての変異を、たとえそれが一塩基における変異であっても、精度よく且つ高速に検出できる検出方法であって、一度により多くの種類の変異を検出できる方法を提供すること。

【解決手段】 標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の配列を検出する方法において、当該プローブの配列の種類が複数であり、当該シグナルの測定が、カイネティックなデータ取得により行う。

【選択図】 図5

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-247023
受付番号	50201270746
書類名	特許願
担当官	藤居 建次 1409
作成日	平成14年 9月 5日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000000376
【住所又は居所】	東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
【氏名又は名称】	オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】	100106909
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3-23-3 ORビル
【氏名又は名称】	棚井 澄雄

【代理人】

【識別番号】	100064908
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル
【氏名又は名称】	志賀国際特許事務所 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】	100101465
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル
【氏名又は名称】	志賀国際特許事務所 青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】	100094400
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル
【氏名又は名称】	志賀国際特許事務所 鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】	100086379
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル
【氏名又は名称】	志賀国際特許事務所 高柴 忠夫

次頁有

認定・付加情報 (続き)

【選任した代理人】

【識別番号】 100118913

【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビ
ル志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】 上田 邦生

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
氏名 オリンパス光学工業株式会社